



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2022-0135920
(43) 공개일자 2022년10월07일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C07K 16/10 (2006.01) G01N 33/569 (2017.01)
(52) CPC특허분류
C07K 16/10 (2013.01)
G01N 33/56983 (2013.01)
(21) 출원번호 10-2021-0042224
(22) 출원일자 2021년03월31일
심사청구일자 2021년03월31일

(71) 출원인
충남대학교산학협력단
대전광역시 유성구 대학로 99 (궁동, 충남대학교)
(72) 발명자
신현진
대전광역시 서구 계룡로264번길 4, 105동 610호(월평동, 월평타운)
박재연
인천광역시 남동구 만수로 14-26, 102동 302호(만수동, 만수주공1단지아파트)
(74) 대리인
리엔목특허법인

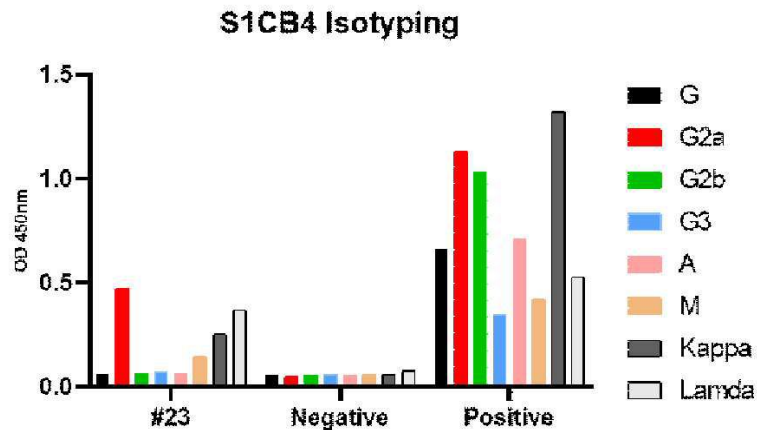
전체 청구항 수 : 총 10 항

(54) 발명의 명칭 돼지 유행성 설사병 바이러스의 스파이크 단백질에 특이적인 단클론항체, 및 이의 용도

(57) 요약

돼지 유행성 설사병 바이러스의 스파이크 단백질에 특이적인 단클론항체, 및 이를 이용한 돼지 유행성 설사병 바이러스 진단용 조성물에 관한 것이다. 일 실시예에 따른 돼지 유행성 설사병 바이러스의 SPIKE 단백질에 특이적으로 결합하는 단클론항체, 및 이를 이용한 돼지 유행성 설사병 바이러스 진단용 조성물을 사용하면, 기존 진단 키트보다 간단한 단계만으로 특이적이고 향상된 민감도로 돼지 유행성 설사병 바이러스를 신속하고 정확하게 검출할 수 있다. 따라서, 현장에서의 빠르고 정확한 진단을 통한 신속한 방역이 가능하여 축산농가의 피해를 줄이는 데에 기여할 것으로 기대된다.

대표도 - 도8



(52) CPC특허분류

G01N 2333/165 (2013.01)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호	1711052113
과제번호	2015R1A2A2A01003785
부처명	과학기술정보통신부
과제관리(전문)기관명	한국연구재단
연구사업명	개인기초연구(미래부)
연구과제명	돼지 유행성 설사병 바이러스의 타겟 포인트 및 OFR3 단백질의 역할에 대한 연구
기 여 율	2/5
과제수행기관명	충남대학교
연구기간	2017.05.01 ~ 2018.04.30

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호	1345176812
과제번호	2011-0023942
부처명	교육과학기술부
과제관리(전문)기관명	한국연구재단
연구사업명	일반연구자지원
연구과제명	돼지유행성 설사병 바이러스의 감염에 대한 proteases의 역할 및 entry mechanism
연구	
기 여 율	3/5
과제수행기관명	충남대학교
연구기간	2012.09.01 ~ 2013.08.31

명세서

청구범위

청구항 1

기탁번호가 KCLRF-BP-00509인 하이브리도마 세포주에 의해 생산되는 것인, 돼지 유행성 설사병 바이러스에 특이적으로 결합하는 단클론항체.

청구항 2

청구항 1에 있어서, 상기 기탁번호가 KCLRF-BP-00509인 하이브리도마 세포주에 의해 생산되는 단클론항체는 돼지 유행성 설사병 바이러스의 스파이크 단백질에 결합하는 것을 특징으로 하는, 단클론항체.

청구항 3

기탁번호가 KCLRF-BP-00509인 하이브리도마 세포주.

청구항 4

청구항 3에 있어서, 상기 기탁번호가 KCLRF-BP-00509인 하이브리도마 세포주는 돼지 유행성 설사병 바이러스의 스파이크 단백질에 결합하는 단클론항체를 생산하는 것인, 하이브리도마 세포주.

청구항 5

기탁번호가 KCLRF-BP-00509인 하이브리도마 세포주에 의해 생산되는 단클론항체를 포함하는, 돼지 유행성 설사병 바이러스 감염 진단용 조성물.

청구항 6

기탁번호가 KCLRF-BP-00509인 하이브리도마 세포주에 의해 생산되는 단클론항체를 포함하는, 돼지 유행성 설사병 바이러스 진단키트.

청구항 7

청구항 1의 단클론항체와 개체로부터 분리된 시료를 접촉시키는 단계; 및

상기 단클론항체 및 시료의 결합에 의해 형성된 복합체를 검출하는 단계를 포함하는, 돼지 유행성 설사병 바이러스의 감염여부를 진단하는 방법.

청구항 8

서열번호 3으로 표시되는 아미노산 서열을 포함하는 중쇄가변영역; 및

서열번호 4로 표시되는 아미노산 서열을 포함하는 경쇄가변영역을 포함하는, 돼지 유행성 설사병 바이러스에 특이적으로 결합하는 단클론항체.

청구항 9

서열번호 3의 아미노산 서열로 이루어진 중쇄가변영역을 암호화하는 폴리뉴클레오티드; 및

서열번호 4의 아미노산 서열로 이루어진 경쇄가변영역을 암호화하는 폴리뉴클레오티드를 포함하는 재조합 벡터.

청구항 10

청구항 9에 있어서, 상기 중쇄가변영역을 암호화하는 폴리뉴클레오티드는 서열번호 5의 뉴클레오티드 서열로 이루어지고, 상기 경쇄가변영역을 암호화하는 폴리뉴클레오티드는 서열번호 6의 뉴클레오티드 서열로 이루어진 것인, 재조합 벡터.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 돼지 유행성 설사병 바이러스의 스파이크 단백질에 특이적인 단클론항체, 및 이를 이용한 돼지 유행성 설사병 바이러스 진단용 조성물에 관한 것이다.

배경 기술

[0003] 돼지 유행성 설사병(porcine epidemic diarrhea: PED)은 원인체인 돼지 유행성 설사병 바이러스(porcine epidemic diarrhea virus: PEDV)의 감염에 의하여 연령에 관계없이 발생하는 돼지의 전염병으로 구토와 수양성 설사가 주요한 증상이다. 또한, 이 질병은 1992년 처음으로 국내에서 발생된 후 전국적으로 확산된 바 있으며, 포유자돈의 설사병 중 가장 큰 피해를 야기하는 질병으로서, 양돈 농가에 많은 경제적 피해를 주고 있다. 돼지 유행성 설사병을 일으키는 유행성 설사병 바이러스는 주로 소장 용모세포에 증식하여 용모 상피세포를 변성 또는 괴사시켜 용모의 위축과 탈락을 동반하고, 흡수장애를 초래하여 지속적인 수양성 설사를 일으킨다. 돼지의 연령에 상관없이 감염을 일으키며 심한 설사와 탈수 현상을 동반하고 심지어 자돈에서의 치사율은 80~90%에 이른다.

[0004] 특히, 돼지 유행성 설사병은 치료가 불가능하기 때문에 예방과 차단방역을 통하여 피해를 경감시켜야 하지만, 조직배양상 증식 및 세포변성효과가 미약하여 실험실 내 진단에 최소 일주일 이상의 시간이 소요되며, 돼지 전염성 위장염 바이러스 감염증과 임상 증상이 동일한 관계로 방역상 많은 문제점을 안고 있다. 현재, 돼지 유행성 설사병에 대한 진단법으로는 ELISA 또는 IFA 방법 등이 사용되고 있을 뿐만 아니라, 진단용 스트립 방법을 이용한 진단 키트 등이 시판되어 이용되고 있다. 그러나, 상기 ELISA 또는 IFA 방법은 실험 시간이 오래 걸리는 단점이 있으며, 스트립을 이용한 진단 키트는 상대적으로 신속하다는 장점이 있지만, 진단 또는 검출의 정확성이 떨어져 진단에 혼란을 주는 경우가 흔하게 발생하는 것으로 보고된 바 있다.

[0005] 이러한 기술적 배경 하에서, 현장에서 신속하고 편리하게 사용할 수 있으면서도 민감도, 특이도, 및 정확도가 향상된 돼지 유행성 설사병 바이러스를 검출할 수 있는 기술의 개발이 필요하다 (한국등록특허 제10-0331177호).

발명의 내용

해결하려는 과제

[0007] 본 발명자들은 종래의 문제점을 해결하기 위하여 예의 노력한 결과, 돼지 유행성 설사병 바이러스의 스파이크 단백질에 특이적인 항체를 다량 분비하는 하이브리도마 세포주를 확립하였으며, 상기로부터 분리된 항체를 이용하여, 돼지 유행성 설사병 바이러스의 감염을 신속하고 정확하게 진단할 수 있음을 확인하고, 이에 기초하여 본 발명을 완성하였다.

[0008] 일 양상은 기탁번호가 KCLRF-BP-00509인 하이브리도마 세포주에 의해 생산되는 것인, 돼지 유행성 설사병 바이

러스에 특이적으로 결합하는 단클론항체를 제공하는 것이다.

[0009] 다른 양상은 기탁번호가 KCLRF-BP-00509인 하이브리도마 세포주를 제공하는 것이다.

[0010] 또 다른 양상은 상기 단클론항체를 포함하는 돼지 유행성 설사병 바이러스 진단용 조성물을 제공하는 것이다.

[0011] 또 다른 양상은 상기 단클론항체를 포함하는 돼지 유행성 설사병 바이러스 진단키트를 제공하는 것이다.

[0012] 또 다른 양상은 상기 단클론항체와 개체로부터 분리된 시료를 접촉시키는 단계; 및 상기 단클론항체 및 시료의 결합에 의해 형성된 복합체를 검출하는 단계를 포함하는 돼지 유행성 설사병 바이러스의 감염여부를 진단하는 방법을 제공하는 것이다.

[0013] 또 다른 양상은 서열번호 3으로 표시되는 아미노산 서열을 포함하는 중쇄가변영역; 및 서열번호 4로 표시되는 아미노산 서열을 포함하는 경쇄가변영역을 포함하는 돼지 유행성 설사병 바이러스에 특이적으로 결합하는 단클론항체를 제공하는 것이다.

[0014] 본 출원의 다른 목적 및 이점은 첨부한 청구범위 및 도면과 함께 하기의 상세한 설명에 의해 보다 명확해질 것이다. 본 명세서에 기재되지 않은 내용은 본 출원의 기술 분야 또는 유사한 기술 분야 내 숙련된 자이면 충분히 인식하고 유추할 수 있는 것이므로 그 설명을 생략한다.

과제의 해결 수단

[0016] 본 출원에서 개시된 각각의 설명 및 실시형태는 각각의 다른 설명 및 실시형태에도 적용될 수 있다. 즉, 본 출원에서 개시된 다양한 요소들의 모든 조합이 본 출원의 범주에 속한다. 또한, 하기 기술된 구체적인 서술에 의하여 본 출원의 범주가 제한된다고 볼 수 없다.

[0018] 일 양상은 기탁번호가 KCLRF-BP-00509인 하이브리도마 세포주에 의해 생산되는 것인, 돼지 유행성 설사병 바이러스에 특이적으로 결합하는 단클론항체를 제공한다.

[0019] 본 명세서에서 사용된 용어, “돼지 유행성 설사병 바이러스(PEDV)”는 돼지에서 유행성 설사병을 유발하는 원인 바이러스로서, 알파코로나바이러스(Alphacoronavirus) 속에 속하며, 단일 가닥의 양방향성 RNA(single-stranded positive-sense RNA)를 유전체로 가진다. 돼지 유행성 설사병 바이러스의 유전체는 4 개의 구조 단백질을 암호화하는 총 7 개의 전자 해석틀(open reading frame, ORF)로 구성되며, 상기 돼지 유행성 설사 바이러스는 구조 단백질로서, 스파이크 단백질, 멤브레인 단백질, 엔벨로프 단백질, 및 뉴클레오캡시드 단백질을 포함한다. 여기서, 스파이크 단백질은 바이러스 표면에 존재하며, 곤봉 모양의 돌기 형태로 이루어진 구조 단백질로서, 상기 단백질은 숙주세포의 당 단백질 수용체와 결합하는 것으로 알려져 있으며, 이는 세포막과 바이러스 외막의 융합, 그리고, 중화 항체의 생성을 야기할 수 있다. 또한, 뉴클레오캡시드 단백질은 외피의 내부에 존재하며, 세포성 면역 반응에 관여하는 것으로 알려져 있다. 구체적으로, 상기 스파이크 단백질은 항원성을 좌우하며, 중화 항체를 유도하는 가장 중요한 단백질이다.

[0020] 상기 스파이크 단백질은 바이러스의 숙주세포로의 부착 및 침입에 가장 중요한 역할을 하는 단백질이지만, 바이러스 증식 과정에서 생산되는 단백질의 양이 다른 구조 단백질에 비해 매우 낮게 발현이 되며, 일반적인 발현 벡터를 활용하여 단백질을 발현해도 그 발현양이 매우 낮아 이를 이용한 백신의 생산이나, 진단용 항체를 제조하는 것은 용이하지 않다. 이에, 대부분의 진단 키트는 상대적으로 단백질 발현물이 매우 높고 쉽게 만들 수 있는 M 또는 N 단백질에 대한 단클론항체들을 이용하는 경우가 대부분으로 알려져 있으며, 현재 시판되고 있는 국내 PED 진단 키트들도 이들 단백질에 대한 단클론항체를 이용한 진단 키트가 사용되고 있는 실정이다. 그러나, 상기 M 또는 N 단백질은 바이러스 표면 안쪽에 있기 때문에 실제로 live한 바이러스가 존재하는 샘플에 대한 진단이라고 한다면 이러한 안 쪽 단백질의 검출만으로는 유효한 진단이 어렵다는 한계가 있다.

[0021] 본 발명에서 용어 "진단"은 시료 또는 실험 샘플 내에 화학종이나 미생물 따위의 존재 유무를 알아내는 것을 의미하며, 본 발명에서의 진단 또는 검출은 바람직하게 돼지 유행성 설사병 바이러스의 존재 유무를 알아내는 것을 의미한다.

[0023] 본 명세서에서 용어 "단클론항체(monoclonal antibody)"는 상기 항체 분자가 단일 분자로 구성되도록 제조된 것

을 의미한다. 단클론항체는 동일한 에피토프를 갖는 항원에 대해서만 반응하는 특이성을 가지며, 또한 특정 에피토프에 대해서만 친화성을 나타낸다.

[0024] 일 양상에 따른 단클론항체는 돼지 유행성 설사병 바이러스의 스파이크 단백질에 결합하는 것일 수 있다.

[0025] 상기 돼지 유행성 설사병 바이러스의 스파이크 단백질은 서열번호 1의 아미노산 서열을 갖는 것일 수 있다. 또한, 상기 돼지 유행성 설사병 바이러스의 스파이크 단백질은 서열번호 2의 유전자 염기서열로부터 암호화되는 것일 수 있다. 상기 서열번호 1 및 2에 해당하는 아미노산 서열 및 염기서열을 하기에 나타내었다.

[0027] **[서열번호 1] 돼지 유행성 설사병 바이러스의 스파이크 단백질의 아미노산 서열**

[0028] M K S L N Y F W L F L P V L S T L S L P Q D V A R C T A N T N F R R F F S K F N V Q A P A I V V L G G Y L P I G E N Q G V N S T W Y C A G Q H P T A S G V H G I F V S H I T G G H G F E I G I S Q E P F D P
S G Y Q L Y L H K A T N G N T N A T A R L R I C Q F P S I K T L G P T A N D V T T G R N C L F N K A V P A H M S E H S V V G I T W D N D R V T V F S D K I Y H F Y F K N D W S R V A T K C Y N S G G C A M
Q Y V Y E P T Y Y T L N V T S A G E D G I S Y Q P C T A N C I G Y A A N V F A T E P N G H I P E G F G F N N W F L L S N D S T L V H G K V V S N Q P L L V N C L L A I P K I Y G L G Q F F S F N Q T M D G V
C N G A A V P R A P E A L R F N I N D T S V I L A E G S I V L H T A L G T N L S F V C S N S S D P H L A T F A I P L G A T Q V P Y Y C F L K V D T Y N S T V Y K F L A V L P P T V R E I V I T K Y G D V Y V
N G F G Y L H L G L L D A V T I N F T G H G T D D D V S G F W T I A S T N F V D A L I E V Q G T A I Q R I L Y C D D P V S Q L K C S Q V A F D L D D G F Y P I S S R N L L S H E Q P I S F V T L P S F N D H
S F V N I T V S A S F G G H S G A N L I A S D T T I N G F S S F C V D T R Q F T I S L F Y N V T N S Y G Y V S N S Q D S N C P F T L Q S V N D Y L S F S K F C V S T S L L A S A C T I D L F G Y P E F G S G
V K F T S L Y F Q F T K G E L I T G T P K P L E G V T D V S F M T L D V C T K Y T I Y G F K G E G I I T L T N S S F L A G V Y Y T S D S G Q L L A F K N V T S G A V Y S V T P C S F S E Q A A Y V D D D I V
G V I S S L S S T F N S T R E L P G F F Y H S N D G S N C T E P V L V Y S N I G V C K S G S I G Y V P S Q S G Q V K I A P T V T G N I S I P T N F S M S I R T E Y L Q L Y N T P V S V D C V T Y V C N G N
S R C K Q L L T Q Y T A V C K T I E S A L Q L S A R L E S V E V N S M L T I S E E A L Q L A T I S S F N G D G Y N F T N V L G V S V Y D P T S G R V V Q K R S F I E D L L F N K V V T N G L G T V D E D Y K
R C T N G R S A A D L V C A Q Y Y S G V M V L P G V V D A E K L H M Y S A S L I G G M V L G G F T S A A L P F S C A V Q A R L N Y L A L Q T D V L Q R N Q Q L L A E S F N S A I G N I T S A F E S V K E A
I S Q T S K G L S T V A H A L T K V Q E V N S Q G A A L T Q L T V Q L Q H N F Q A I S S S I D D I Y S R L D I L S A D V Q V D R L I T G R L S A L N A F V A Q T L T K Y T E V Q A S R K L A Q K V N E C
V K S Q S Q R Y G F C G G D G E H I F S L V Q A A P Q G L L F L H T V L V P S D F V D V I A I A G L C V N D E I A L I L R E P G L V L F T H E L Q N H T A I E Y F V S S R R M F E P R K P T V S D F V Q I E
S C V V T Y V N L T R D Q L P D V I P D Y I D V N K T L D E I L A S L P N R T G P S L P L D V F N A T Y L N L T G E I A D L E Q R S E F L R N T T E D L K S L I Y N I N N T L V D L E W L N R V E T Y I K W
P W W V W L I I F I V L I F V V S L L V F C C I S T G C C G C G C C C A C F S G C C R G P R L Q P Y E V F E K V H V Q

[0030] **[서열번호 2] 돼지 유행성 설사병 바이러스의 스파이크 단백질의 염기서열**

[0031] atgaagtctt taaattactt ctggttggtt ttaccagttac tttcaacact tagtctacca
[0032] caagatgtcg ccaggtgac cgctaatact aattttaggc ggttcttttc aaaatttaaat
[0033] gttcaggcgc ctgcaattgt tgtactgggc ggttatctac ctattggtga aaatcagggt
[0034] gttaattcaa cttaggtattg tgctggccaa catccaactg ctatggcgt tcatggtatc
[0035] tttgttagcc atattacagg tggctatggc tttagattg gcatttcgca agagcctttt
[0036] gaccctagtg gttaccagct ttatttacct aaggctacta acggtaacac taatgctact
[0037] gcgcgactgc gcatttgcca gtttcctagc atcaaaacat tgggccccac tgctaataat
[0038] gatgttataa caggctgtaa ttgcctattt aacaaagcag tcccagctca tatgagttaa
[0039] catagtgttg tcggcataac atgggataat gatcgtgtca ctgtcttttc tgacaagatc
[0040] tatcattttt attttaaaaa tgactgggtcc cgtgttgcca caaagtgtta caacagtgga
[0041] ggttggtgcta tgcaatatgt ttacgaaccc acctactaca cgcttaatgt tactagtgt
[0042] ggtgaggatg gcattttcta tcaaccctgt acagctaatt gcattggtta tgctgccaat
[0043] gtatttgcta ctgagcccaa tggccacata ccagaagggt ttggttttaa taattggttc
[0044] cttttgtcca atgattccac tttagtgcat ggtaagggtg tttccaacca accattgttg
[0045] gtttaattgtc ttttgccat tcctaagatt tacggactag gccaattttt ctctttaat
[0046] caaacgatgg atggcggttg taatggagct gctgtgccgc gtgcaccaga ggctctgagg

[0047] tttaatatta atgacacctc tgtcattctt gctgaaggct caattgtact tcatactgct

[0048] ttaggaacaa atctttcttt tgtttgcagt aattcttcag atcctcatct agctaccttc

[0049] gccataacctc tgggtgctac ccaggtaacct tattattgtt ttcttaaagt ggatacttac

[0050] aactccactg tttataaatt ttggctggt ttacctccta ccgtcaggga aattgtcatc

[0051] accaagtatg gtgatgttta tgtcaatggg ttgggctact tgcactctcg tttgttggat

[0052] gctgtcacia ttaatttcac tggatcatggc actgacgatg atgtttctgg tttttggacc

[0053] atagcatcga ctaattttgt tgatgcactc atcgaagttc aaggaaccgc cattcagcgt

[0054] attctttatt gtgatgatcc tgttagccaa ctcaagtgtt ctgaggttgc ttttgacctt

[0055] gacgatgggt tttacctat ttcttctaga aaccttctga gtcacgaaca gccaatctt

[0056] tttgttactc tgccatcatt taatgatcat tcttttgta acattactgt atctgcttcc

[0057] tttggtggtc atagtgtgc caaccttatt gcatctgaca ctactatcaa tgggtttagt

[0058] tctttctgtg ttgacactag acaatttacc atttactgt tttataacgt taaaaacagt

[0059] tatggttatg tgtctaactc acaagacagt aattgccctt tcaccttgca atctgttaat

[0060] gattacctgt cttttagcaa attttgtgt tccaccagcc ttttggttag tgcctgtacc

[0061] atagatcttt ttggttacc tgagtgtgt agtgggtgta agtttacgtc cttttacttt

[0062] caattcacia aggggtgagtt gattactggc acgcctaaac cacttgaagg tgtcacggac

[0063] gtttctttta tgactctgga tgtgtgtacc aagtatacta tctatggctt taaaggtgag

[0064] ggtatcatta cccttaciaa ttcaagcttt ttggcagggtg tttattacac atctgattct

[0065] ggacagttgt tagcctttaa gaatgtcact agtgggtgctg tttattctgt tacgccatgt

[0066] tctttttcag agcaggctgc atatgttgat gatgatatag tgggtgttat ttctagtttg

[0067] tctagctcca cttttaacag tactagggag ttgcctgggt tcttctacca ttctaagtat

[0068] ggctctaatt gtacagagcc tgtgttgggt tatagtaaca taggtgtttg taaatctggc

[0069] agtattggct acgtcccatc tcagctggc caagtcaaga ttgcaccac ggttactggg

[0070] aatattagta ttcccacaa ctttagtatg agtattagga cagaatattt acagctttac

[0071] aacacgcctg ttagtgttga ttgtgtcaca tatgtttgta atggtaactc tcgttgtaaa

[0072] caattactca ccagttacac tgcagtatgt aagaccatag agtcagcatt acaactcagc

[0073] gctaggcttg agtctgttga agttaactct atgcttacta tttccgaaga ggctctacag

[0074] ttagccacca ttagttcgtt taatgggtgat ggatataatt ttactaatgt gctgggtgtt

[0075] tctgtgtatg atcctacaag tggcagggtg gtacaaaaaa ggtcttttat tgaagacctg

[0076] ctttttaata aagtgggttac taatggcctt ggtactgttg atgaagacta taagcgtgt

[0077] actaatggtc gctctgcggc agatctagtc tgtgcacagt attactctgg tgtcatggta

[0078] ctacctgggt ttgttgacgc tgagaagctt catatgtata gtgcgtctct catcggtgggt

[0079] atgggtgctag gaggttttac ttctgcagcg gcattgcctt ttagctgtgc tgttcaagct

[0080] agactcaatt atcttgctct acagacggat gttctacagc ggaatcagca attgcttgct

[0081] gagtctttta actctgctat tggtaataata acttcagcct ttgagagtgt taaagaggct

[0082] attagtcaaa ctccaagggt tttgagcact gtagcccatg cgcttactaa ggttcaagag

[0083] gtgtttaact cgcagggtgc agctttgact caacttaccg tacagctgca acacaacttc
 [0084] caagccattt ctagttctat tgatgacatt tactctcgac tggacattct ttcagccgat
 [0085] gttcaggttg accgtctcat caccggcaga ttatcagcac ttaatgcttt tgttgctcaa
 [0086] accctcacta agtatactga gggttcaggct agcaggaagt tagcacagca aaaggttaat
 [0087] gagtgcgtta aatcgcaatc tcagcgttat ggtttttgtg gtggigatgg cgagcacatt
 [0088] ttctctctgg tacaggcagc acctcagggc ctgctgtttt tacatacagt acttgtaccg
 [0089] agtgattttg tagatgttat tgccatcgct ggcttatgcg ttaacgatga aattgccttg
 [0090] attctacgtg agcctggctt agtcttgctt acgcatgaac ttcaaatca tactgcgatt
 [0091] gaatatittg ttctatcgcg acgtatgttt gaacctagaa aacctaccgt tagtgatttt
 [0092] gttcaaatg agagtgtgt gggtcacctat gtcaattga ctagagacca actaccagat
 [0093] gtaatcccag attacatcga tgtaacaaa acacttgatg agattttagc ttctctgccc
 [0094] aatagaactg gtccaagtct tccttttagat gtttttaatg ccacttatct taatctcact
 [0095] ggtgaaattg cagatttaga gcagcgttca gagtttctcc gtaatactac agaggatctc
 [0096] aaaagcttta tatataatat caacaacaca ctagttgacc ttgagtggct caaccgagtt
 [0097] gagacataca tcaagtggcc gtgggtgggtt tggttgatta ttttcattgt tctcatcttt
 [0098] gttgtgtcat tactagtgtt ctgctgcatt tccacgggtt gttgtggatg ctgcggctgc
 [0099] tgctgtgctt gtttctcagg ttgtttagg ggtcctagac ttcaacctta cgaagttttt
 [0100] gaaaagggtcc acgtgcagtg a

[0102] 상기 스파이크 단백질은 에피토프(epitope)를 포함할 수 있다.

[0103] 본 명세서에서 용어 "특이적으로 결합(specifically binding)" 또는 "특이적으로 인식(specifically recognizing)"은 당업자에게 통상적으로 알려진 의미와 동일한 것으로서, 항원 및 항체가 특이적으로 상호작용하여 항원-항체 복합체를 형성할 수 있으며, 또한 면역학적 반응을 하는 것을 의미할 수 있다.

[0104] 완전한 항체는 2개의 전장(full length) 경쇄 및 2개의 전장 중쇄를 가지는 구조이며 각각의 경쇄는 중쇄와 이황화 결합(disulfide bond, SS-bond)으로 결합한다. 항체의 불변 영역은 중쇄 불변 영역과 경쇄 불변 영역으로 나뉘어지며, 중쇄 불변 영역은 감마(γ), 뮤(μ), 알파(α), 델타(δ) 및 엡실론(ϵ) 타입을 가지고, 서브클래스로 감마1(γ 1), 감마2(γ 2), 감마3(γ 3), 감마4(γ 4), 알파1(α 1) 및 알파2(α 2)를 가질 수 있다. 경쇄의 불변 영역은 카파(κ) 및 람다(λ) 타입을 가질 수 있다.

[0106] 상기 하이브리도마(hybridoma) 세포는 당업계에 공지된 방법을 사용하여 제조할 수 있다. 바람직하게는, 상기 하이브리도마 세포는 heterologous injection 방법으로 면역화시킨 동물로부터 유래한 세포를 이용하여 제조할 수 있다. Heterologous injection은 하나의 항원만을 접종하여 항체를 유도하는 것이 아니라, 다른 항원을 1차적으로 접종하여 마지막에 원하는 항원을 접종하는 방식으로, 단클론항체를 보다 안정적으로(stable) 제조할 수 있는 이점이 있다.

[0107] 일 구체예에 있어서, 상기 하이브리도마 세포는 heterologous injection 방법을 통해 전 바이러스(whole virus)인 PEDV 표준 균주를 동물에 면역시키고, 상기 피면역 동물로부터 유래된 항체 생산세포인 비장 세포를 골수종 세포와 융합시켜서 하이브리도마를 제조한 다음, 그 중에서 돼지 유행성 설사병 바이러스 스파이크 단백질에 특이적으로 결합하는 단클론항체를 생산하는 하이브리도마를 선택하는 방법으로 제조할 수 있다. 상기 피면역 동물은 실시예에서 사용된 마우스뿐만 아니라 염소, 양, 모르모트, 래트 또는 토끼와 같은 동물을 사용할 수 있다.

- [0108] 상기 피면역 동물을 면역시키는 방법으로서는 당업계에서 이미 공지된 방법을 사용할 수 있다. 예를 들어, 마우스를 면역시키는 경우 1회에 1 내지 100 μ g의 면역원을 동량의 생리 식염수 및/또는 프로인드 어주번트(Freund's adjuvant) 등의 항원 보조제로 유화시켜, 상기 피면역원 동물의 복부의 피하 또는 복강 내에 2-5주마다 2-6회 접종시키는 방법으로 수행될 수 있다. 피면역 동물을 면역시킨 후에는 최종 면역 3-5일 후 비장 또는 림프절을 적출하여 당업계에서 이미 공지되어 있는 세포 융합법에 따라서, 융합 촉진제의 존재 하에 이들의 조직에 포함되어 있는 B 세포를 골수종세포와 융합시키게 된다. 상기 융합 촉진제는 예를 들어, 폴리에틸렌 글리콜(PEG)과 같은 물질을 사용할 수 있다. 상기 골수종세포는 예를 들어, P3U1, NS-1, P3x63, Ag 8.653, Sp2/0-Ag14와 같은 마우스 유래 세포, AG1, AG2와 같은 래트 유래 세포를 사용할 수 있다. 또한 상기 당업계에 공지된 세포 융합법은 예를 들어, B 세포와 골수종세포를 1:1-10:1의 비율로 혼합시켜, 이에 분자량 1,000-6,000의 PEG를 10-80%의 농도로 첨가하여, 30-37°C에서 1-10분 동안 배양하는 방법으로 수행될 수 있다. 또한, 상기 PED의 스파이크 단백질에 특이적으로 결합하는 단클론항체를 생산하는 하이브리도마는 예를 들어, 하이브리도마만이 생존 가능한 HAT 배지 등의 선택 배지에서 배양하고, 하이브리도마 배양 상층액 중의 항체 활성을 ELISA 등의 방법을 이용하여 측정하여 선택할 수 있다. 최종적으로, PED의 스파이크 단백질에 특이적으로 결합하는 단클론항체를 생산하는 하이브리도마는 예를 들어, PED의 스파이크 단백질에 특이적으로 결합하는 단클론항체를 생산하는 하이브리도마에 대하여, 한계 희석 등의 방법에 의해 클로닝을 반복함으로써 선별될 수 있다.
- [0109] 상기 단클론항체는 IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgM, IgE, IgA1, IgA5, 또는 IgD 타입일 수 있다. 일 구체예에 있어서, IgG를 많이 분비하는 하이브리도마 세포주를 1차적으로 선별 후, 선별된 하이브리도마 세포주에 대하여 이소타이핑(isotyping)을 실시하였다. 그 결과, 선별된 하이브리도마 세포주는 돼지 유행성 설사병 바이러스의 스파이크 단백질에 특이적인 초기항체 IgM 및/또는 IgA를 다량으로 분비하여 의 초기 진단에 유용하게 사용될 수 있음을 확인하였다.
- [0111] 다른 양상은 상술한 단클론항체에 따른 항원 결합 단편을 제공한다.
- [0112] 용어 "항체(antibody)"는 돼지 유행성 설사병 바이러스에 대한 특이 항체로서, PED의 스파이크 단백질 단백질에 대해 특이적으로 결합하며, 완전한 항체, 항체 분자의 항원 결합 단편, 합성 항체, 재조합 항체, 또는 항체 하이브리드(antibody hybrid)를 포함할 수 있다. 완전한 항체에 대한 설명은 상기 언급한 바와 같다.
- [0113] 본 명세서에서 용어 "항원 결합 단편(antigen binding fragment)"은 면역글로불린 전체 구조에 대한 그의 단편으로, 항원이 결합할 수 있는 부분을 포함하는 폴리펩티드의 일부를 의미한다. 예를 들어, F(ab')₂, Fab', Fab, Fv 또는 scFv일 수 있다. 상기 항원 결합 단편 중 Fab는 경쇄 및 중쇄의 가변영역과 경쇄의 불변 영역 및 중쇄의 첫 번째 불변 영역(CH1)을 가지는 구조로 1개의 항원 결합 부위를 가진다. Fab'는 중쇄 CH1 도메인의 C-말단에 하나 이상의 시스테인 잔기를 포함하는 힌지 영역(hinge region)을 가진다는 점에서 Fab와 차이가 있다. F(ab')₂ 항체는 Fab'의 힌지 영역의 시스테인 잔기가 디설파이드 결합을 이루면서 생성된다. Fv는 중쇄 가변부위 및 경쇄 가변부위만을 가지고 있는 최소의 항체 조각으로 Fv 단편을 생성하는 재조합 기술은 당업계에 널리 공지되어 있다. 이중쇄 Fv(two-chain Fv)는 비공유 결합으로 중쇄 가변부위와 경쇄 가변부위가 연결되어 있고 단쇄 Fv(single-chain Fv)는 일반적으로 펩타이드 링커를 통하여 중쇄의 가변 영역과 단쇄의 가변 영역이 공유 결합으로 연결되거나 또는 C-말단에서 바로 연결되어 있어서 이중쇄 Fv와 같이 다이머와 같은 구조를 이룰 수 있다. 상기 항원 결합 단편은 단백질 가수분해 효소를 이용해서 얻을 수 있다(예를 들어, 전체 항체를 파파인으로 제한 절단하면 Fab를 얻을 수 있고 펩신으로 절단하면 F(ab')₂ 단편을 얻을 수 있다). 또한 상기 항원 결합 단편은 유전자 재조합 기술을 통하여 제작할 수 있다.
- [0114] 상기 항체는 단클론항체, 이중특이적 항체, 비-인간 항체, 인간 항체, 인간화 항체, 키메라 항체, 단쇄 Fv(scFv), 단쇄 항체, Fab 단편, F(ab') 단편, 다이설파이드-결합 Fv(sdFv) 및 항-이디오타입(항-Id) 항체, 그리고 상기 항체들의 에피토프-결합 단편을 포함하나 이에 한정되는 것은 아니다.
- [0115] 본 명세서의 에피토프, 항체, 또는 항체 단편은 본 명세서에 기재된 서열뿐만 아니라, 이의 생물학적 균등물들도 포함할 수 있다. 예를 들면, 항체의 결합 친화도 및/또는 기타 생물학적 특성을 보다 더 개선시키기 위하여 항체의 아미노산 서열에 추가적인 변화를 줄 수 있다. 이러한 변형은, 예를 들어 항체의 아미노산 서열 잔기의 결실, 삽입 및/또는 치환을 포함한다. 이러한 아미노산 변이는 아미노산 결사슬 치환체의 상대적 유사성, 예컨대, 소수성, 친수성, 전하, 크기 등에 기초하여 이루어진다. 아미노산 결사슬 치환체의 크기, 모양 및 종류에 대한 분석에 의하여, 아르기닌, 라이신과 히스티딘은 모두 양전하를 띤 잔기이고; 알라닌, 글라이신과 세린은

유사한 크기를 갖으며; 페닐알라닌, 트립토판과 타이로신은 유사한 모양을 갖는다는 것을 알 수 있다. 따라서, 이러한 고려 사항에 기초하여, 아르기닌, 라이신과 히스티딘; 알라닌, 글라이신과 세린; 그리고 페닐알라닌, 트립토판과 타이로신은 생물학적으로 기능 균등물이라 할 수 있다.

- [0117] 또 다른 양상은 기탁번호가 KCLRF-BP-00509인 하이브리도마 세포주를 제공한다.
- [0118] 상기 하이브리도마 세포의 제조 방법은 상기한 바와 같다. 또한, 하기 실시예에 따라 제조된 상기 하이브리도마 세포는 2021년 02월 16일자로 부다페스트 조약 하의 국제 기탁기관인 한국세포주연구재단 (KCLRF)에 기탁하였다. 한편, 기탁된 하이브리도마 세포는 미생물 기탁에 대한 부다페스트 조약의 규정에 따라 보관되고 상기 수탁 번호를 참조하여 일반인들에게 분양이 가능하다.
- [0120] 또 다른 양상은 상기 기탁번호가 KCLRF-BP-00509인 하이브리도마 세포주에 의해 생산되는 단클론항체를 포함하는 돼지 유행성 설사병 바이러스 감염 진단용 조성물을 제공한다.
- [0121] 상기 조성물은 돼지 유행성 설사병 바이러스 스파이크 단백질에 특이적으로 결합하는 단클론항체를 포함하여, 돼지 유행성 설사병 바이러스의 민감하고 정확한 진단이 가능하다.
- [0122] 상기 조성물은 항체를 액체 중에서 포함하는 액체 조성물일 수 있다. 상기 액체는 상기 항체를 용해시킬 수 있고 유지시킬 수 있는 것일 수 있다. 예를 들면, 물, 또는 PBS와 같은 버퍼 용액일 수 있다. 상기 조성물은 상기 항체를 안정하게 유지하는 물질을 더 포함할 수 있다.
- [0124] 또 다른 양상은 기탁번호가 KCLRF-BP-00509인 하이브리도마 세포주에 의해 생산되는 단클론항체를 포함하는 돼지 유행성 설사병 바이러스 진단키트를 제공한다.
- [0125] 상기 진단키트는 액체 시료가 가해지는 샘플 패드, 일 양상에 따른 단클론항체가 고정된 멤브레인 및 액체 시료를 흡수할 수 있는 흡수 패드를 포함한다. 구체적으로, 상기 멤브레인은 돼지 유행성 설사병 바이러스 스파이크 단백질에 특이적으로 결합하는 단클론항체가 고정된 3개의 시험선(test line) 및 시료가 전개되었다는 것을 확인하기 위한 대조선(control line)을 포함할 수 있다.
- [0126] 상기 대조선에는 시료가 전개되었다는 것을 확인하기 위해 액체 시료에 포함되는 대조군 항체에 특이적으로 결합하는 항체가 고정될 수 있다.
- [0127] 구체적으로, 상기 대조군 항체로는 마우스 IgG, 토끼 IgG 등을 사용할 수 있으나 이에 제한되는 것은 아니다.
- [0128] 본 발명의 키트에 적용되는 상기 "시료"는 돼지 유행성 설사병 바이러스 항체의 유무 및 정도를 측정하고자 하는 동물 유래의 혈청일 수 있다.
- [0129] 상기 키트는 검출가능한 모이어티를 더 포함할 수 있다. 검출가능한 모이어티(detectable moiety)는 모이어티의 존재, 상대적 양 및/또는 위치(예를 들면, 어레이상의 위치)가 직접적으로 또는 간접적으로 결정될 수 있는 모이어티를 포함할 수 있다. 상기 검출가능한 모이어티는 해당 기술분야에서 잘 알려져 있다. 예를 들면, 검출가능한 모이어티는 특정 조건에 노출될 경우, 검출될 수 있는 것으로, 형광성 모이어티, 발광성 모이어티, 화학발광성 모이어티, 방사성 모이어티(예, 방사성 원자), 및 효소 모이어티로 구성된 군으로부터 선택될 수 있다. 예를 들면, 형광 모이어티는 형광성 모이어티의 여기(excitation)를 야기하는 특정 파장 및 강도에서 방사선(radiation)에 노출될 필요가 있을 수 있고, 이에 의해 검출될 수 있는 특정 파장(wavelength)에서 검출가능한 형광을 발산하게 할 수 있다.
- [0130] 상기 키트는 항원 또는 항체와 같은 면역화학 성분의 고상 담체로서 다공성 물질을 이용하는 면역분석 키트일 수 있다. 본 발명의 일 구체예에서 사용되는 검체패드, 저장 패드, 크로마토그래피 막 물질 및 흡습 패드는 분석될 액체 시료를 수용하고 포함하기 충분한 다공성(porosity)과 부피를 가진 물질이며, 예를 들면 마이크로다공성 막 물질일 수 있다. 상기 마이크로다공성 막 물질의 예에는 나일론, 셀룰로즈 물질, 폴리술폰, 폴리비닐리덴 디플루오라이드, 폴리에스테르 및 유리 섬유가 포함된다. 상기 마이크로다공성 막 물질의 바람직한 예는, 니트로셀룰로스 막이다. 상기 분석 장치는 스트립의 형태를 가질 수 있다.

[0132] 또 다른 양상은 일 양상에 따른 단클론항체를 사용하여 돼지 유행성 설사병 바이러스를 진단하는 방법을 제공한다. 상기 방법은 예를 들어, 일 양상에 따른 단클론항체와 개체로부터 분리된 시료를 접촉시키는 단계; 및 상기 단클론항체 및 시료의 결합에 의해 형성된 복합체를 검출하는 단계를 포함할 수 있다. 상기 방법은 PEDV의 정량적 또는 정성적 검출 또는 진단하는데 사용될 수 있다. 구체적으로, 상기 진단 방법은 생물학적 샘플(예를 들어, 혈액, 혈청, 세포 또는 조직)로부터 또는 PED를 앓고 있거나 발생할 위험이 있는 대상으로부터 분변이나 장기 시료에서의 돼지 유행성 설사병 바이러스를 특이적으로 검출할 수 있다. 본 명세서에 있어서, 검출은 정량 및/또는 정성 분석을 포함하는 것, 즉 존재, 부존재의 검출 및 바이러스 양(titer)의 검출을 포함하는 것으로 이러한 방법은 당업계에 공지되어 있으며, 당업자라면 본원의 실시를 위해 적절한 방법을 선택할 수 있다.

[0134] 또 다른 양상은 서열번호 3으로 표시되는 아미노산 서열을 포함하는 중쇄가변영역; 및 서열번호 4로 표시되는 아미노산 서열을 포함하는 경쇄가변영역을 포함하는 돼지 유행성 설사병 바이러스에 특이적으로 결합하는 단클론항체를 제공한다.

[0135] 바람직하게는, 상기 중쇄가변영역은 서열번호 3의 아미노산 서열로 이루어지고, 상기 경쇄가변영역은 서열번호 4의 아미노산 서열로 이루어진 것일 수 있다. 또한, 상기 중쇄가변영역을 암호화하는 폴리뉴클레오티드는 서열번호 5로 표시되는 뉴클레오티드 서열로 이루어진 것일 수 있고, 상기 경쇄가변영역을 암호화하는 폴리뉴클레오티드는 서열번호 6으로 표시되는 뉴클레오티드 서열로 이루어진 것일 수 있다. 상기 서열번호 3 내지 6에 해당하는 아미노산 서열 및 뉴클레오티드 서열을 하기 표 1에 나타내었다.

표 1

구분	서열	서열번호
VH	GAELVKPGASVKFSCSASGCKNIKDTMYLMKQRPEQGLEWIGRIDPANGNTKYDPKFQGRATMTADTSSNTAYLQLSLT SEDAAVYYCVRWSYSFDYWGQGTTLTVSS	3
VL	DIVLTQSTLSLPVSLGDAQISICRSSHQIVHSNGNTYLEWYLKQPGQSPKLLIYKVSNRFGVDPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDLGVYYCFQGSHVPLTFGAGTKLELKRADAAPTIVSKG	4
VH	GGGGCAGAGCTTGTAAGCCAGGGGCTCAGTCAAGTTCTCTGCTCAGCTTCTGGCTGCAACATTAAGACACCTATATGTACTTGATGAAGCAGAGGCCTGAACAGGGCCTGGAGTGGATTGGAAGGATTGATCCTGCGAATGGTAATACTAAATATGACCCGAAGTTCCAGGGCAGGGCCACTATGACAGCGGACACATCCTCCAACACAGCCTACCTGCAGCTCAGCAGCCTGACATCTGAGGACGCTGCCGTCTATTACTGTGTAGATGGAGTTATTCATTTGACTACTGGGGCAAGGCACCACTCTCACAGTCTCTCTCA	5
VL	GACATTGTGCTGACCCAGTCTACACTCTCCCTGCCTGTGAGTCTTGGAGATCAAGCCTCCATCTCTTGCAGATCTAGTCA GAGCATTGTACATAGTAATGGAAACACCTATTTAGAATGGTACCTGCAGAAACAGGCCAGTCTCCAAAGCTCCTGATCTACAAAGTTTCCAACCGATTTTCTGGGGTCCAGACAGGTTCAAGTGGCAGTGGATCAGGGACAGATTTACACTCAAGATCAGCAGAGTGGAGGCTGAGGATCTGGGAGTTTATTACTGCTTTCAAGTTTCACATGTTCCGCTCACATTCGGTGTCTGGGACCAAGCTGGAGCTGAAACGGGCTGATGCTGCACCACTGTATCCAAGGGC	6

[0138] 본 명세서에서, 용어 "폴리뉴클레오티드(polynucleotide)"는 단일가닥 또는 이중가닥 형태로 존재하는 디옥시리보뉴클레오티드 또는 리보뉴클레오티드의 중합체이다. RNA 게놈 서열, DNA(gDNA 및 cDNA) 및 이로부터 전사되는 RNA 서열을 포괄하며, 특별하게 다른 언급이 없는 한 천연의 폴리뉴클레오티드의 유사체를 포함한다. 상기 폴리뉴클레오티드는 상기 돼지 유행성 설사병 바이러스에 특이적으로 결합하는 항체의 중쇄 가변 영역 또는 경쇄 가변 영역의 아미노산 서열을 암호화하는 뉴클레오티드 서열뿐만 아니라, 그 서열에 상보적인(complementary) 서열도 포함한다.

[0139] 상기 상보적인 서열은 완벽하게 상보적인 서열뿐만 아니라, 실질적으로 상보적인 서열도 포함하며, 이는 당업계에 공지된 엄격 조건(stringent conditions) 하에서, 예를 들어, 돼지 유행성 설사병 바이러스에 특이적으로 결합하는 항체의 중쇄가변영역 또는 경쇄가변영역의 아미노산 서열을 암호화하는 뉴클레오티드 서열의 뉴클레오티드 서열과 혼성화될 수 있는 서열을 의미한다.

[0140] 또한, 상기 중쇄가변영역 및/또는 경쇄가변영역의 아미노산 서열을 암호화하는 뉴클레오티드 서열은 변형될 수 있다. 상기 변형은 뉴클레오티드의 추가, 결실 또는 비보존적 치환 또는 보존적 치환을 포함한다.

[0141] 상기 돼지 유행성 설사병 바이러스에 특이적으로 결합하는 항체의 중쇄가변영역 및/또는 경쇄가변영역의 아미노산 서열을 암호화하는 폴리뉴클레오티드는 상기 뉴클레오티드 서열에 대하여 실질적인 동일성을 나타내는 뉴클

레오티드 서열도 포함하는 것으로 해석된다.

- [0142] 상기의 실질적인 동일성은, 상기 뉴클레오티드 서열과 임의의 다른 서열을 최대한 대응되도록 얼라인(align)하고, 당업계에서 통상적으로 이용되는 알고리즘을 이용하여 얼라인된 서열을 분석한 경우에, 최소 80%의 상동성, 최소 90%의 상동성 또는 최소 95%의 상동성을 나타내는 서열일 수 있다.
- [0143] 또 다른 양상은 돼지 유행성 설사병 바이러스에 특이적으로 결합하는 단클론항체의 중쇄가변영역을 암호화하는 폴리뉴클레오티드 및 경쇄가변영역을 암호화하는 폴리뉴클레오티드를 포함하는 재조합 벡터를 제공한다.
- [0144] 본 명세서에서, 용어 "벡터"는 숙주세포에서 목적 유전자를 발현시키기 위한 수단을 의미한다. 예를 들어, 플라스미드 벡터, 코즈미드 벡터 및 박테리오파지 벡터, 아데노바이러스 벡터, 레트로바이러스 벡터 및 아데노-연관 바이러스 벡터와 같은 바이러스 벡터를 포함한다. 상기 재조합 벡터로 사용될 수 있는 벡터는 당업계에서 종종 사용되는 플라스미드 (예를 들면, pSC101, pGV1106, pACYC177, ColE1, pKT230, pME290, pBR322, pUC8/9, pUC6, pBD9, pHc79, pIJ61, pLAFR1, pHV14, pGEX 시리즈, pET 시리즈 및 pUC19 등), 파지 (예를 들면, λ gt4 λ B, λ -Charon, λ Δ z1 및 M13 등) 또는 바이러스(예를 들면, SV40 등)를 조작하여 제작될 수 있다.
- [0145] 상기 재조합 벡터에서 상기 중쇄가변영역 및 경쇄가변영역의 아미노산 서열을 암호화하는 폴리뉴클레오티드는 프로모터에 작동가능하게 연결될 수 있다. 용어 "작동가능하게 연결된(operatively linked)"은 뉴클레오티드 발현 조절 서열(예: 프로모터 서열)과 다른 뉴클레오티드 서열 사이의 기능적인 결합을 의미한다. 따라서, 이에 의해 상기 조절 서열은 상기 다른 뉴클레오티드 서열의 전사 및/또는 해독을 조절할 수 있다.
- [0146] 상기 재조합 벡터는, 전형적으로 클로닝을 위한 벡터 또는 발현을 위한 벡터로서 구축될 수 있다. 상기 발현용 벡터는 당업계에서 식물, 동물 또는 미생물에서 외래의 단백질을 발현하는 데 사용되는 통상의 것을 사용할 수 있다. 상기 재조합 벡터는 당업계에 공지된 다양한 방법을 통해 구축될 수 있다.
- [0147] 상기 재조합 벡터는 원핵 세포 또는 진핵 세포를 숙주로 하여 구축될 수 있다. 예를 들어, 사용되는 벡터가 발현 벡터이고, 원핵 세포를 숙주로 하는 경우에는, 전사를 진행시킬 수 있는 강력한 프로모터(예컨대, pL λ 프로모터, trp 프로모터, lac 프로모터, tac 프로모터, T7 프로모터 등), 해독의 개시를 위한 라이보솜 결합 자리 및 전사/해독 종결 서열을 포함하는 것이 일반적이다. 진핵 세포를 숙주로 하는 경우에는, 벡터에 포함되는 진핵 세포에서 작동하는 복제원점은 f1 복제원점, SV40 복제원점, pMB1 복제원점, 아데노 복제원점, AAV 복제원점 및 BBV 복제원점 등을 포함하나, 이에 한정되는 것은 아니다.
- [0148] 또한, 포유동물 세포의 계능으로부터 유래된 프로모터 (예: 메탈로티오닌 프로모터) 또는 포유동물 바이러스로부터 유래된 프로모터 (예: 아데노바이러스 후기 프로모터, 백시니아 바이러스 7.5K 프로모터, SV40 프로모터, 사이토메갈로바이러스 프로모터 및 HSV의 tk 프로모터)가 이용될 수 있으며, 전사 종결 서열로서 폴리아데닐화 서열을 일반적으로 갖는다.
- [0149] 한편, 상기 항체의 중쇄가변영역 및 경쇄가변영역을 발현할 수 있는 벡터는 중쇄가변영역 및 경쇄가변영역이 하나의 벡터에서 동시에 발현되는 벡터 시스템이거나 또는 중쇄가변영역 및 경쇄가변영역을 각각 별도의 벡터에서 발현시키는 시스템 모두 가능하다. 후자의 경우, 두 벡터는 동시 형질전환 (co-transformation) 및 표적 형질전환 (targeted transformation)을 통하여 숙주세포로 도입될 수 있다.
- [0151] 또 다른 양상은 상기 재조합 벡터로 형질전환된 숙주세포를 제공한다.
- [0152] 상기 재조합 벡터를 안정되면서 연속적으로 클로닝 또는 발현시킬 수 있는 숙주세포는 당업계에 공지된 어떠한 숙주세포도 이용할 수 있으며, 원핵 세포로는, 예를 들어, *E. coli* JM109, *E. coli* BL21, *E. coli* RR1, *E. coli* LE392, *E. coli* B, *E. coli* X 1776, *E. coli* W3110, 바실러스 서브틸리스, 바실러스 쉐린겐시스와 같은 바실러스 속 균주, 그리고 살모넬라 티피무리움, 세라티아 마르세센스 및 다양한 슈도모나스 종과 같은 장내균과 균주 등이 있으며, 진핵 세포에 형질 전환시키는 경우에는 숙주세포로서, 효모(*Saccharomyces cerevisiae*), 곤충 세포, 식물 세포 및 동물 세포, 예를 들어, Sp2/0, CHO(Chinese hamster ovary) K1, CHO DG44, PER.C6, W138, BHK, COS-7, 293, HepG2, Huh7, 3T3, RIN 및 MDCK 세포주 등이 이용될 수 있다.
- [0153] 상기 폴리뉴클레오티드 또는 이를 포함하는 재조합 벡터의 숙주세포 내로의 운반은, 당업계에 널리 알려진 운반 방법을 사용할 수 있다. 상기 운반 방법은 예를 들어, 숙주세포가 원핵 세포인 경우, CaCl_2 방법 또는 전기 천공 방법 등을 사용할 수 있고, 숙주세포가 진핵 세포인 경우에는, 미세 주입법, 칼슘 포스페이트 침전법, 전기

천공법, 리포좀-매개 형질감염법 및 유전자 밤바드먼트 등을 사용할 수 있으나, 이에 한정하지는 않는다.

[0154] 상기 형질전환된 숙주세포를 선별하는 방법은 선택 표지에 의해 발현되는 표현형을 이용하여, 당업계에서 널리 알려진 방법에 따라 용이하게 실시할 수 있다. 예를 들어, 상기 선택 표지가 특정 항생제 내성 유전자인 경우에는, 상기 항생제가 함유된 배지에서 형질전환체를 배양함으로써 형질전환체를 용이하게 선별할 수 있다.

[0155] 일 구체예에 따른 돼지 유행성 설사병 바이러스 스파이크 단백질에 특이적으로 결합하는 단클론항체 및 이를 포함하는 돼지 유행성 설사병 바이러스 진단용 조성물 및 키트, 및 이를 사용한 돼지 유행성 설사병 바이러스의 진단 방법에 따르면, 돼지 유행성 설사병 바이러스의 감염 여부를 신속하고 정확하게 진단할 수 있다.

발명의 효과

[0157] 돼지 유행성 설사병 바이러스에 특이적으로 결합하는 단클론항체, 및 이를 이용한 돼지 유행성 설사병 바이러스 감염 진단용 조성물을 사용하면, 비교적 용이한 방법을 통해서 특이적이고 향상된 민감도로 돼지 유행성 설사병 바이러스를 신속하고 정확하게 검출할 수 있다. 따라서, 현장에서의 빠르고 정확한 진단을 통한 신속한 방역이 가능하여 양돈 농가의 피해를 줄이는 데에 기여할 것으로 기대된다.

도면의 간단한 설명

[0159] 도 1은 돼지 유행성 설사병 바이러스 스파이크 단백질을 코딩하는 유전자의 합성을 개략적으로 나타낸 모식도이다.

도 2는 돼지 유행성 설사병 바이러스 스파이크 단백질을 발현 및 정제하는 과정을 개략적으로 나타낸 모식도이다.

도 3은 일 실시예에 따른 형질감염된 세포에서, 웨스턴 블롯(western blotting)을 통해 스파이크 단백질 발현을 확인한 결과이다.

도 4는 일 실시예에 따른 단클론항체가 유도된 마우스의 혈청에서, ELISA를 통해 돼지 유행성 설사병 바이러스 스파이크 단백질 항원에 대한 항체 생성능을 확인한 결과를 나타낸 도이다.

도 5는 돼지 유행성 설사병 바이러스의 스파이크 단백질 항원에 대한 단클론항체를 분비하는 잡종세포인 하이브리도마를 제조하는 과정을 개략적으로 나타낸 도이다.

도 6은 돼지 유행성 설사병 바이러스의 스파이크 단백질에 대한 단클론항체 생산 결과이다.

도 7은 Direct ELISA를 통해 일 양상에 따른 단클론항체의 돼지 유행성 설사병 바이러스의 스파이크 단백질 특이적 IgG 생산능을 확인한 도이다.

도 8은 IgG 생산능 기준으로 선별한 대표적인 19개 하이브리도마 세포주에서 단클론항체의 이소타이핑(isotyping) 분석 결과이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0160] 이하 실시예를 통하여 보다 상세하게 설명한다. 그러나, 이들 실시예는 예시적으로 설명하기 위한 것으로 본 발명의 범위가 이들 실시예에 한정되는 것은 아니다.

[0162] 실시예 1: 돼지 유행성 설사병 바이러스의 스파이크 단백질 유전자의 합성 및 발현

[0163] 본 실시예에서는 돼지 유행성 설사병 바이러스의 스파이크 단백질을 코딩하는 유전자의 발현을 위하여, 상기 유전자에 대한 진핵세포 내에서의 발현물을 높이기 위하여, 각 유전자의 5' 말단에 Kozak sequence를 추가하고, 코돈-최적화를 수행하여, PEDV Spike protein을 합성하였다. 이후, 도 2에 나타낸 바와 같이, 상기 합성된 유전자를 pcDNA myc-his 3.1(-) 벡터에 클로닝한 후, 상기 벡터를 HEK 293T 세포에 형질감염시켰다. 이후, 상기 형질감염된 세포로부터 발현된 스파이크 단백질을 확인하고 정제하였다.

[0164] 그 결과, 도 3에 나타낸 바와 같이, 일 실시예에 따른 과정에 따라 수득한 상층액에서, 각각 돼지 유행성 설사

병 바이러스 스파이크 단백질의 밴드를 확인하였다.

[0166] 실시예 2: 돼지 유행성 설사병 바이러스의 스파이크 단백질에 특이적인 단클론항체의 제조

[0167] 본 실시예에서는 하기 표 2에 나타난 바와 같이 heterogenous injection 방법을 이용하여 마우스에서의 단클론항체 생산을 유도하였다.

표 2

[0168]

	injection	Intervals
1 st injection	CNUP1F-2019	-
2 nd injection	CNUP1F-2019	12 days
3 rd injection	CNUP1F-2019 S protein	12 days

[0170] 구체적으로, 1차 및 2차 접종에서는 마우스에 whole virus인 CNUP1F-2019 접종하였고, 3차 접종에서는 상기 실시예 1에서 제조된 CNUP1F-2019 Spike 단백질 항원을 접종하였다. 상기 접종은 12일 간격으로 진행되었으며, 3차 접종 후 3일째, 마우스의 혈액을 채취하여 이들로부터 생산된, Spike 단백질에 대한 항체 생산능을 ELISA를 통하여 확인하였다.

[0171] 그 결과, 도 4에 나타난 바와 같이, 상기와 같이 항체 생성이 유도된 마우스의 혈청에서, Spike 단백질에 대한 ELISA 흡광도(O.D)값이 약 3 부근에서 측정되어 높은 항체가를 확인할 수 있었다.

[0173] 실시예 3: 돼지 유행성 설사병 바이러스의 스파이크 단백질에 특이적인 단클론항체의 생산을 위한 하이브리도마의 제조

[0174] 본 실시예에서는 상기 실시예 2에서의 3차 접종 후 3일째, 마우스의 비장을 적출하고 비장 세포를 분리하여 골수종 세포(myeloma)와 융합(fusion)시켜 돼지 유행성 설사병 바이러스의 스파이크 단백질 항원에 대한 단클론항체를 분비하는 잡종세포인 하이브리도마(hybridoma)를 생산하였다.

[0175] 이어서, 생산한 하이브리도마를 ELISA 방법으로 선별하고 하이브리도마 콜로니(colony)를 지속적으로 성숙, 및 번식시켜 단클론 유도를 실시하였으며(single cell expansion), 총 192개의 단세포 클론(single cell clone)을 확보하였다. 상기 단클론항체 생산 모식도를 도 5에, 생산된 PEDV 스파이크 단백질에 대한 단세포 클론 일부를 도 6에 나타내었다.

[0177] 실시예 4: 단클론항체 항원성 비교 평가

[0178] 실시예 2와 동일한 방법으로, 단세포 클론으로의 전환을 지속적으로 실시하여 총 1008개의 하이브리도마 세포 중 융합을 유발하는 PEDV 스파이크 단백질에 대하여 각각 192개씩을 선별하여 융합 콜로니(fusion colony)를 일일이 확인하였다. Direct ELISA 방법을 통해, 융합된 191개 하이브리도마 세포들의 배양액에서 PEDV 스파이크 단백질 특이적 IgG를 비교적 많이 분비하는 하이브리도마 세포주를 선별하였다. 그 결과를 도 7에 나타내었다.

[0180] 실시예 5: 단클론항체 이소타이핑(isotyping) 분석

[0181] 실시예 4에서 IgG를 많이 분비하는 하이브리도마 세포주를 선별한 결과, 최종적으로 세포주 19개를 선별하였다. 각 하이브리도마 세포주의 배양 상층액을 취하여 단클론항체의 면역글로불린(immunoglobulin) 이소타입(isotype)을 ELISA 방법으로 분석하였다.

[0182] 구체적으로, 마우스 IgG1, IgG2a, IgG2b, IgG3, IgA, IgM에 각각 특이적으로 결합하는 염소(Goat)의 항체를 PBS(pH 7.4) 용액을 이용하여 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 의 농도로 희석시키고, 효소면역흡착검사용 플레이트에 100 μL 씩 분주한 후, 37°C에서 1시간 반응시켰다. 그 다음 0.1% PBS/T 용액을 이용하여 각각의 웰(Well)을 3회 세척하고, 블로킹

(Blocking)을 위해 1% 소혈청알부민(Bovine serum albumin, BSA)이 포함된 PBS/T 용액을 각각의 웰에 200 μ l씩 분주하여 37°C에서 1시간 반응시킨 다음 PBS/T 용액을 이용하여 같은 방법으로 세척해 주었다. 그 다음 상기 실시예 2의 단클론항체를 100 μ l 분주하여 37°C에서 1시간 반응시켰으며, 반응이 끝난 후 0.1% PBS/T 용액을 이용하여 각각의 웰을 3회 세척해 주었다. 그 다음 HRP 효소가 연결된 염소의 항-마우스 IgG (Goat anti-mouse IgG, HRP conjugated)를 각각의 웰에 분주하여 37°C에서 30분 동안 반응시킨 다음 같은 방법으로 세척하였다. 이후 HRP의 기질인 TMB 용액 100 μ l씩을 각각의 웰에 분주하여 상온에서 15분 동안 반응시켜 발색반응을 확인하였다. 그 다음 반응종결용액(Stop solution)인 0.5 N H₂SO₄ 용액 100 μ l씩을 각각의 웰에 분주하여 반응을 종결시켰다. 각각의 이소타입 반응성에 대한 수치화를 위해 마이크로플레이트 리더를 이용하여 450 nm에서 흡광도를 측정하였다. 그 결과를 도 7 및 8에 나타내었다.

[0183] 도 7 및 8에 나타낸 바와 같이, 19개 세포주 중 PEDV 스파이크 단백질 특이적인 초기 항체인 IgG2을 다량으로 분비하는 세포주로서, S1CB4를 확인하였다. 상기 하이브리도마 세포주를 한국세포주연구재단(Korean Cell Line Research Foundation: KCLRF)에 기탁하여 기탁번호 KCLRF-BP-00509를 부여받았다.

[0184] 상기 결과를 통해, 상기 하이브리도마 세포주로부터 수득한 단클론항체는 IgM, 및 IgA 유형이 모두 발현되고, PEDV 스파이크 단백질 특이적 단클론항체를 분비하여, 감염 초기에 신속하고 정확한 바이러스 진단이 가능함을 확인하였다.

[0185]

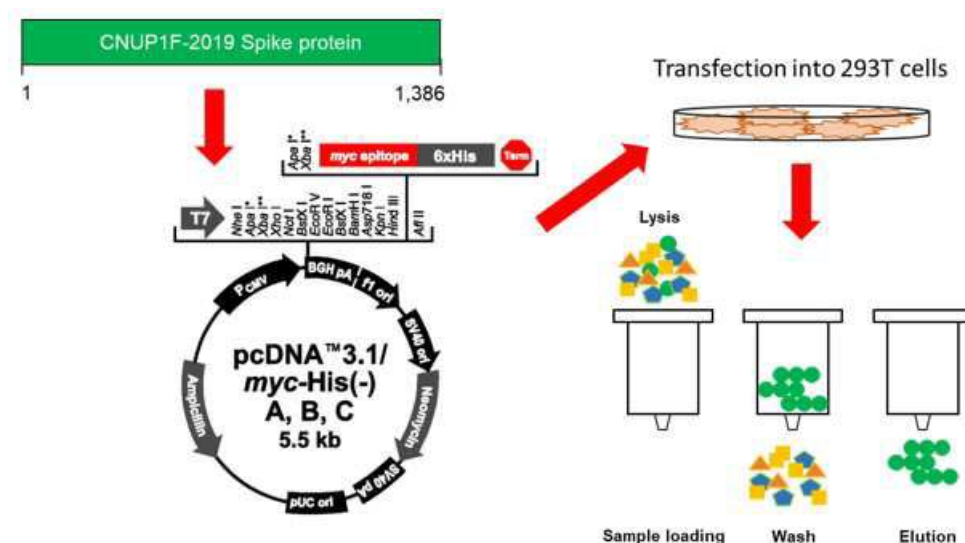
[0186] 전술한 본 발명의 설명은 예시를 위한 것이며, 본 발명이 속하는 기술분야의 통상의 지식을 가진 자는 본 발명의 기술적 사상이나 필수적인 특징을 변경하지 않고서 다른 구체적인 형태로 쉽게 변형이 가능하다는 것을 이해할 수 있을 것이다. 그러므로 이상에서 기술한 실시예들은 모든 면에서 예시적인 것이며 한정적이 아닌 것으로 이해해야만 한다.

도면

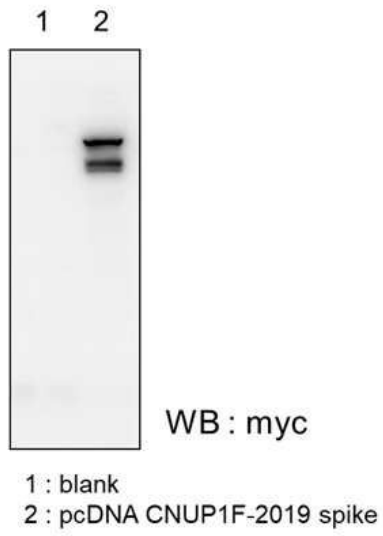
도면1



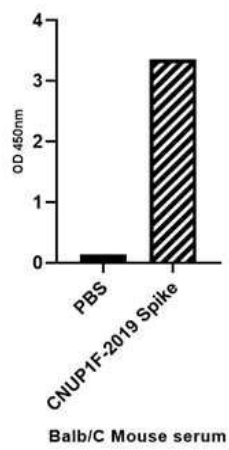
도면2



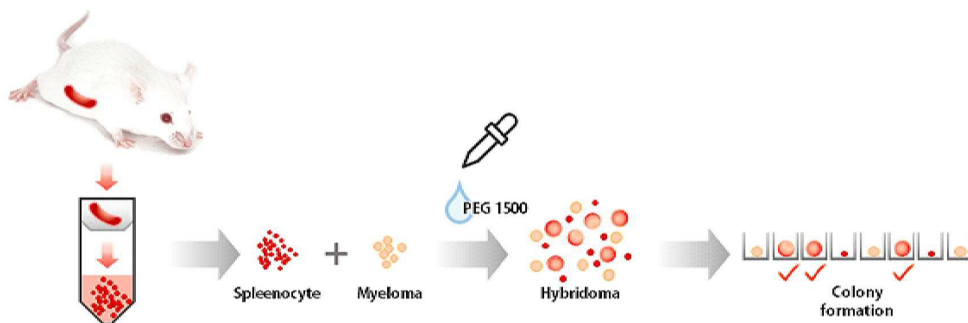
도면3



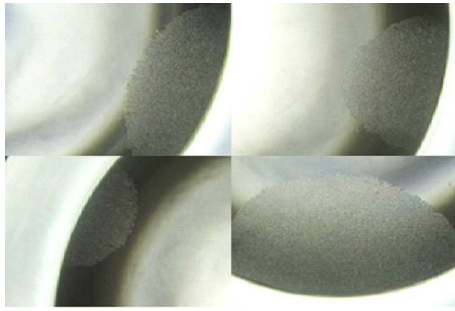
도면4



도면5

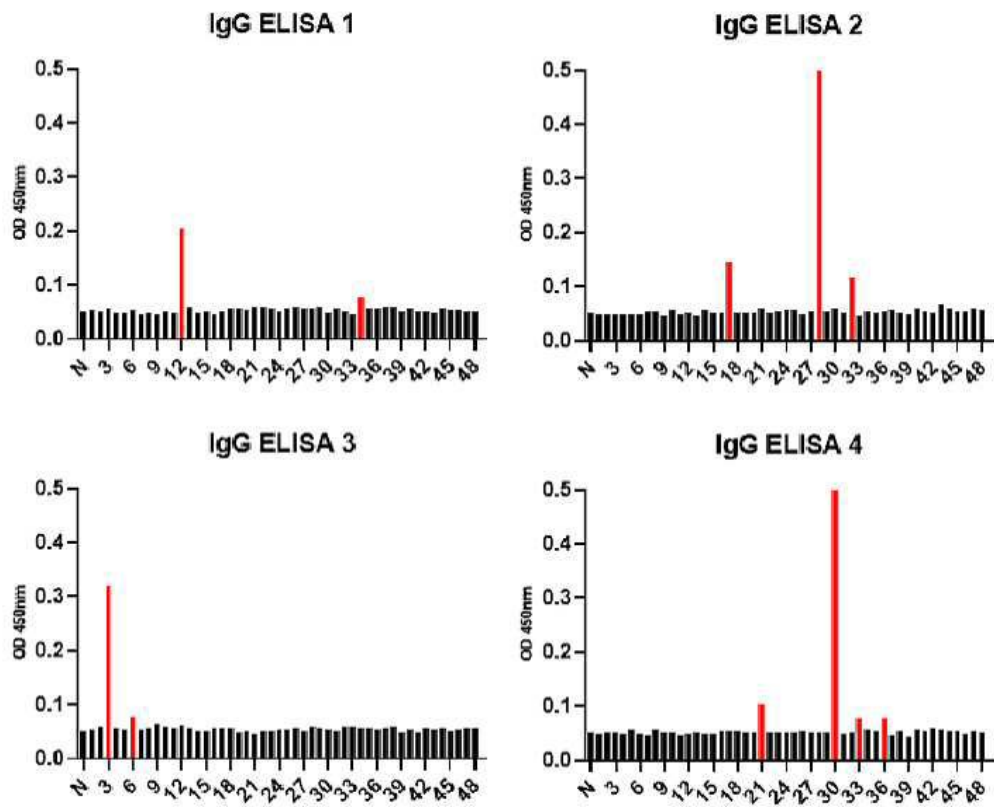


도면6

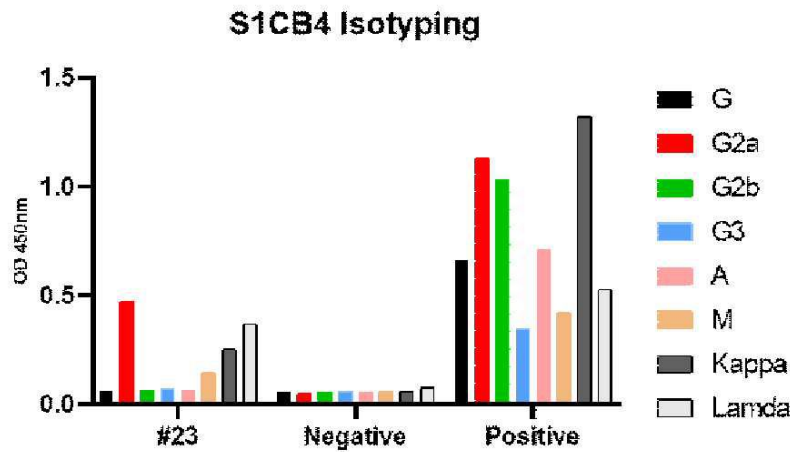


25X manification

도면7



도면8



서열목록

<110> The Industry & Academic Cooperation in Chungnam National University (IAC)

<120> Monoclonal antibody specific to spike protein of Porcine epidemic diarrhea virus and use thereof

<130> PN132969

<160> 6

<170> KoPatent In 3.0

<210> 1

<211> 1386

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> PEDV SPIKE

<400> 1

Met Lys Ser Leu Asn Tyr Phe Trp Leu Phe Leu Pro Val Leu Ser Thr

1 5 10 15

Leu Ser Leu Pro Gln Asp Val Ala Arg Cys Thr Ala Asn Thr Asn Phe

20 25 30

Arg Arg Phe Phe Ser Lys Phe Asn Val Gln Ala Pro Ala Ile Val Val

35 40 45

Leu Gly Gly Tyr Leu Pro Ile Gly Glu Asn Gln Gly Val Asn Ser Thr

50 55 60

Trp Tyr Cys Ala Gly Gln His Pro Thr Ala Ser Gly Val His Gly Ile
 65 70 75 80
 Phe Val Ser His Ile Thr Gly Gly His Gly Phe Glu Ile Gly Ile Ser
 85 90 95

 Gln Glu Pro Phe Asp Pro Ser Gly Tyr Gln Leu Tyr Leu His Lys Ala
 100 105 110
 Thr Asn Gly Asn Thr Asn Ala Thr Ala Arg Leu Arg Ile Cys Gln Phe
 115 120 125
 Pro Ser Ile Lys Thr Leu Gly Pro Thr Ala Asn Asn Asp Val Thr Thr
 130 135 140
 Gly Arg Asn Cys Leu Phe Asn Lys Ala Val Pro Ala His Met Ser Glu
 145 150 155 160
 His Ser Val Val Gly Ile Thr Trp Asp Asn Asp Arg Val Thr Val Phe

 165 170 175
 Ser Asp Lys Ile Tyr His Phe Tyr Phe Lys Asn Asp Trp Ser Arg Val
 180 185 190
 Ala Thr Lys Cys Tyr Asn Ser Gly Gly Cys Ala Met Gln Tyr Val Tyr
 195 200 205
 Glu Pro Thr Tyr Tyr Thr Leu Asn Val Thr Ser Ala Gly Glu Asp Gly
 210 215 220
 Ile Ser Tyr Gln Pro Cys Thr Ala Asn Cys Ile Gly Tyr Ala Ala Asn
 225 230 235 240

 Val Phe Ala Thr Glu Pro Asn Gly His Ile Pro Glu Gly Phe Gly Phe
 245 250 255
 Asn Asn Trp Phe Leu Leu Ser Asn Asp Ser Thr Leu Val His Gly Lys
 260 265 270
 Val Val Ser Asn Gln Pro Leu Leu Val Asn Cys Leu Leu Ala Ile Pro
 275 280 285
 Lys Ile Tyr Gly Leu Gly Gln Phe Phe Ser Phe Asn Gln Thr Met Asp
 290 295 300
 Gly Val Cys Asn Gly Ala Ala Val Pro Arg Ala Pro Glu Ala Leu Arg

305 310 315 320
 Phe Asn Ile Asn Asp Thr Ser Val Ile Leu Ala Glu Gly Ser Ile Val
 325 330 335
 Leu His Thr Ala Leu Gly Thr Asn Leu Ser Phe Val Cys Ser Asn Ser
 340 345 350
 Ser Asp Pro His Leu Ala Thr Phe Ala Ile Pro Leu Gly Ala Thr Gln
 355 360 365
 Val Pro Tyr Tyr Cys Phe Leu Lys Val Asp Thr Tyr Asn Ser Thr Val
 370 375 380

 Tyr Lys Phe Leu Ala Val Leu Pro Pro Thr Val Arg Glu Ile Val Ile
 385 390 395 400
 Thr Lys Tyr Gly Asp Val Tyr Val Asn Gly Phe Gly Tyr Leu His Leu
 405 410 415
 Gly Leu Leu Asp Ala Val Thr Ile Asn Phe Thr Gly His Gly Thr Asp
 420 425 430
 Asp Asp Val Ser Gly Phe Trp Thr Ile Ala Ser Thr Asn Phe Val Asp
 435 440 445
 Ala Leu Ile Glu Val Gln Gly Thr Ala Ile Gln Arg Ile Leu Tyr Cys

 450 455 460
 Asp Asp Pro Val Ser Gln Leu Lys Cys Ser Gln Val Ala Phe Asp Leu
 465 470 475 480
 Asp Asp Gly Phe Tyr Pro Ile Ser Ser Arg Asn Leu Leu Ser His Glu
 485 490 495
 Gln Pro Ile Ser Phe Val Thr Leu Pro Ser Phe Asn Asp His Ser Phe
 500 505 510
 Val Asn Ile Thr Val Ser Ala Ser Phe Gly Gly His Ser Gly Ala Asn
 515 520 525

 Leu Ile Ala Ser Asp Thr Thr Ile Asn Gly Phe Ser Ser Phe Cys Val
 530 535 540
 Asp Thr Arg Gln Phe Thr Ile Ser Leu Phe Tyr Asn Val Thr Asn Ser
 545 550 555 560
 Tyr Gly Tyr Val Ser Asn Ser Gln Asp Ser Asn Cys Pro Phe Thr Leu

565 570 575
 Gln Ser Val Asn Asp Tyr Leu Ser Phe Ser Lys Phe Cys Val Ser Thr
 580 585 590
 Ser Leu Leu Ala Ser Ala Cys Thr Ile Asp Leu Phe Gly Tyr Pro Glu

 595 600 605
 Phe Gly Ser Gly Val Lys Phe Thr Ser Leu Tyr Phe Gln Phe Thr Lys
 610 615 620
 Gly Glu Leu Ile Thr Gly Thr Pro Lys Pro Leu Glu Gly Val Thr Asp
 625 630 635 640
 Val Ser Phe Met Thr Leu Asp Val Cys Thr Lys Tyr Thr Ile Tyr Gly
 645 650 655
 Phe Lys Gly Glu Gly Ile Ile Thr Leu Thr Asn Ser Ser Phe Leu Ala
 660 665 670

 Gly Val Tyr Tyr Thr Ser Asp Ser Gly Gln Leu Leu Ala Phe Lys Asn
 675 680 685
 Val Thr Ser Gly Ala Val Tyr Ser Val Thr Pro Cys Ser Phe Ser Glu
 690 695 700
 Gln Ala Ala Tyr Val Asp Asp Asp Ile Val Gly Val Ile Ser Ser Leu
 705 710 715 720
 Ser Ser Ser Thr Phe Asn Ser Thr Arg Glu Leu Pro Gly Phe Phe Tyr
 725 730 735
 His Ser Asn Asp Gly Ser Asn Cys Thr Glu Pro Val Leu Val Tyr Ser

 740 745 750
 Asn Ile Gly Val Cys Lys Ser Gly Ser Ile Gly Tyr Val Pro Ser Gln
 755 760 765
 Ser Gly Gln Val Lys Ile Ala Pro Thr Val Thr Gly Asn Ile Ser Ile
 770 775 780
 Pro Thr Asn Phe Ser Met Ser Ile Arg Thr Glu Tyr Leu Gln Leu Tyr
 785 790 795 800
 Asn Thr Pro Val Ser Val Asp Cys Val Thr Tyr Val Cys Asn Gly Asn
 805 810 815

Ser Arg Cys Lys Gln Leu Leu Thr Gln Tyr Thr Ala Val Cys Lys Thr
820 825 830

Ile Glu Ser Ala Leu Gln Leu Ser Ala Arg Leu Glu Ser Val Glu Val
835 840 845

Asn Ser Met Leu Thr Ile Ser Glu Glu Ala Leu Gln Leu Ala Thr Ile
850 855 860

Ser Ser Phe Asn Gly Asp Gly Tyr Asn Phe Thr Asn Val Leu Gly Val
865 870 875 880

Ser Val Tyr Asp Pro Thr Ser Gly Arg Val Val Gln Lys Arg Ser Phe
885 890 895

Ile Glu Asp Leu Leu Phe Asn Lys Val Val Thr Asn Gly Leu Gly Thr
900 905 910

Val Asp Glu Asp Tyr Lys Arg Cys Thr Asn Gly Arg Ser Ala Ala Asp
915 920 925

Leu Val Cys Ala Gln Tyr Tyr Ser Gly Val Met Val Leu Pro Gly Val
930 935 940

Val Asp Ala Glu Lys Leu His Met Tyr Ser Ala Ser Leu Ile Gly Gly
945 950 955 960

Met Val Leu Gly Gly Phe Thr Ser Ala Ala Ala Leu Pro Phe Ser Cys
965 970 975

Ala Val Gln Ala Arg Leu Asn Tyr Leu Ala Leu Gln Thr Asp Val Leu
980 985 990

Gln Arg Asn Gln Gln Leu Leu Ala Glu Ser Phe Asn Ser Ala Ile Gly
995 1000 1005

Asn Ile Thr Ser Ala Phe Glu Ser Val Lys Glu Ala Ile Ser Gln Thr
1010 1015 1020

Ser Lys Gly Leu Ser Thr Val Ala His Ala Leu Thr Lys Val Gln Glu
1025 1030 1035 1040

Val Val Asn Ser Gln Gly Ala Ala Leu Thr Gln Leu Thr Val Gln Leu
1045 1050 1055

Gln His Asn Phe Gln Ala Ile Ser Ser Ser Ile Asp Asp Ile Tyr Ser
1060 1065 1070

Arg Leu Asp Ile Leu Ser Ala Asp Val Gln Val Asp Arg Leu Ile Thr
1075 1080 1085

Gly Arg Leu Ser Ala Leu Asn Ala Phe Val Ala Gln Thr Leu Thr Lys
1090 1095 1100

Tyr Thr Glu Val Gln Ala Ser Arg Lys Leu Ala Gln Gln Lys Val Asn
1105 1110 1115 1120

Glu Cys Val Lys Ser Gln Ser Gln Arg Tyr Gly Phe Cys Gly Gly Asp
1125 1130 1135

Gly Glu His Ile Phe Ser Leu Val Gln Ala Ala Pro Gln Gly Leu Leu
1140 1145 1150

Phe Leu His Thr Val Leu Val Pro Ser Asp Phe Val Asp Val Ile Ala
1155 1160 1165

Ile Ala Gly Leu Cys Val Asn Asp Glu Ile Ala Leu Ile Leu Arg Glu
1170 1175 1180

Pro Gly Leu Val Leu Phe Thr His Glu Leu Gln Asn His Thr Ala Ile
1185 1190 1195 1200

Glu Tyr Phe Val Ser Ser Arg Arg Met Phe Glu Pro Arg Lys Pro Thr
1205 1210 1215

Val Ser Asp Phe Val Gln Ile Glu Ser Cys Val Val Thr Tyr Val Asn
1220 1225 1230

Leu Thr Arg Asp Gln Leu Pro Asp Val Ile Pro Asp Tyr Ile Asp Val
1235 1240 1245

Asn Lys Thr Leu Asp Glu Ile Leu Ala Ser Leu Pro Asn Arg Thr Gly
1250 1255 1260

Pro Ser Leu Pro Leu Asp Val Phe Asn Ala Thr Tyr Leu Asn Leu Thr
1265 1270 1275 1280

Gly Glu Ile Ala Asp Leu Glu Gln Arg Ser Glu Phe Leu Arg Asn Thr
1285 1290 1295

Thr Glu Asp Leu Lys Ser Leu Ile Tyr Asn Ile Asn Asn Thr Leu Val
1300 1305 1310

Asp Leu Glu Trp Leu Asn Arg Val Glu Thr Tyr Ile Lys Trp Pro Trp

1315 1320 1325
 Trp Val Trp Leu Ile Ile Phe Ile Val Leu Ile Phe Val Val Ser Leu
 1330 1335 1340
 Leu Val Phe Cys Cys Ile Ser Thr Gly Cys Cys Gly Cys Cys Gly Cys
 1345 1350 1355 1360
 Cys Cys Ala Cys Phe Ser Gly Cys Cys Arg Gly Pro Arg Leu Gln Pro
 1365 1370 1375
 Tyr Glu Val Phe Glu Lys Val His Val Gln
 1380 1385

<210> 2

<211> 4161

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> PEDV SPIKE

<400> 2

atgaagtctt taaattactt ctggttggtt ttaccagttac tttcaacact tagtctacca 60
 caagatgtcg ccaggtgcac cgctaatact aattttaggc ggttcttttc aaaatttaac 120
 gttcaggcgc ctgcaattgt tgtactgggc ggttatctac ctattggtga aaatcagggt 180
 gtttaattcaa cttaggtattg tgctggccaa catccaactg ctatggcggt tcatggtatc 240
 tttgttagcc atattacagg tgggtcatggc tttgagattg gcatttcgca agagcctttt 300
 gaccctagtg gttaccagct ttatttacat aaggctacta acggtaacac taatgctact 360

 gcgcgactgc gcatttgcca gtttcctagc atcaaaacat tgggccccac tgctaataat 420
 gatgttaciaa caggtcgtaa ttgcctatit aacaaagcag tcccagctca tatgagtga 480
 catagtgttg tcggcataac atgggataat gatcgtgtca ctgtcttttc tgacaagatc 540
 tatcatitit attttaaaaa tgactgggtcc cgtgttgcca caaagtgtta caacagtgga 600
 ggttgtgcta tgcaatatgt ttacgaaccc acctactaca cgcttaagt tactagtgt 660
 ggtgaggatg gcatttctta tcaaccctgt acagctaatt gcattggtta tgctgccaat 720
 gtatttgcta ctgagcccaa tggccacata ccagaagggt ttggttttaa taattggttc 780

 cttttgtcca atgattccac tttggtgcat ggtaagggtg tttccaacca accattgttg 840
 gttaatgttc ttttgccat tcttaagatt tacggactag gccaatitit ctcttttaac 900
 caaacgatgg atggcgtttg taatggagct gctgtgccgc gtgcaccaga ggctctgagg 960
 tttaatatta atgacacctc tgtcattctt gctgaaggct caattgtact tcatactgt 1020

ttaggaacaa atctttcttt tgtttgcagt aattcttcag atcctcatct agctaccttc	1080
gccatacctc tgggtgctac ccaggtacct tattattgtt ttcttaaagt ggatacttac	1140
aactccactg ttataaaatt ttggctgtt ttacctccta ccgtcaggga aattgtcatc	1200
accaagtatg gtgatgttta tgtcaatggg ttggctact tgcactcgg tttgttggat	1260
gctgtcacia ttaatttcac tggatcatggc actgacgatg atgtttctgg tttttggacc	1320
atagcatcga ctaattttgt tgatgcactc atcgaagttc aaggaaccgc cattcagcgt	1380
attctttatt gtgatgatcc tgttagccaa ctcaagtgtt ctgaggttgc ttttgacctt	1440
gacgatggtt ttaccctat ttctcttaga aaccttctga gtcacgaaca gccaatctct	1500
tttgttactc tgccatcatt taatgatcat tcttttgta acattactgt atctgcttcc	1560
tttgggtggc atagtgggtc caaccttatt gcatctgaca ctactatcaa tgggtttagt	1620
tctttctgtg ttgacactag acaatttacc atttactgt ttataacgt taaaaacagt	1680
tatggttatg tgtctaactc acaagacagt aattgccctt tcaccttgca atctgttaat	1740
gattacctgt cttttagcaa attttgtgt tccaccagcc ttttggctag tgcctgtacc	1800
atagatcttt ttggttaccg tgagtttggg agtgggtgta agtttacgtc cttttacttt	1860
caattcacia aggggtgagtt gattactggc acgcctaac cacttgaagg tgtcacggac	1920
gtttctttta tgactctgga tgtgtgtacc aagtatacta tctatggctt taaaggtgag	1980
ggtatcatta ccttacaaa ttcaagcttt ttggcagggtg ttatttacac atctgattct	2040
ggacagtgtg tagcctttaa gaatgtcact agtgggtctg tttattctgt tacgccatgt	2100
tctttttcag agcaggetgc atatgttgat gatgatatag tgggtgttat ttctagtttg	2160
tctagctcca cttttaacag tactagggag ttgcctgggt tcttctacca ttctaagat	2220
ggctctaatt gtacagagcc tgtgttgggt tatagtaaca taggtgtttg taaatctggc	2280
agtattggct acgtcccatc tcagtctggc caagtcaaga ttgcaccac ggttactggg	2340
aatattagta ttcccacaa ctttagtatg agtattagga cagaatattt acagctttac	2400
aacacgctg ttagtgtga ttgtgtcaca tatgtttgta atggttaactc tcgtttgaaa	2460
caattactca ccaggtacac tgcagtatgt aagaccatag agtcagcatt acaactcagc	2520
gctaggcttg agtctgttga agttaactct atgcttacta tttccgaaga ggctctacag	2580
ttagccacca ttagttcgtt taatgggtat ggatataatt ttactaatgt gctgggtgtt	2640
tctgtgatg atcctacaag tggcaggggt gtacaaaaa ggtcttttat tgaagacctg	2700
ctttttaata aagtggttac taatggcctt ggtactgttg atgaagacta taagcgtgt	2760
actaatggtc gctctgcggc agatctagtc tgtgcacagt attactctgg tgtcatggta	2820

ctacctggtg ttgttgacgc tgagaagcct catatgtata gtgcgtctct catcggtggt 2880

atggtgctag gaggttttac ttctgcagcg gcattgcctt ttagctgtgc tgttcaagct 2940

agactcaatt atcttgctct acagacggat gttctacagc ggaatcagca attgcttgct 3000

gagtctttta accttgctat tggtaataata acttcagcct ttgagagtgt taaagaggct 3060

attagtcaaa cttccaaggg tttagcact gtagcccatg cgcttactaa ggttcaagag 3120

gttgtttaact cgcagggtgc agctttgact caacttaccg tacagctgca acacaacttc 3180

caagccattt ctagttctat tgatgacatt tactctcgac tggacattct ttcagccgat 3240

gttcaggttg accgtctcat caccggcaga ttatcagcac ttaatgcttt tgttgctcaa 3300

accctcacta agtatactga gggttcaggct agcaggaagt tagcacagca aaaggttaat 3360

gagtgcgtta aatcgcaatc tcagcgttat ggtttttgtg gtggtgatgg cgagcacatt 3420

ttctctctgg tacaggcagc acctcagggc ctgctgtttt tacatacagt acttgtagcg 3480

agtgattttg tagatgttat tgccatcgct ggcttatgcg ttaacgatga aattgccttg 3540

attctacgtg agcctggctt agtcttgctt acgcatgaac ttcaaatca tactgagatt 3600

gaatatattg ttcatcgcg acgtatgttt gaacctagaa aacctaccgt tagtgatttt 3660

gttcaaatg agagtgtgtg ggtcacctat gtcaatttga ctagagacca actaccagat 3720

gtaatcccag attacatcga tgtaacaaa acatttgatg agatttttagc ttctctgccc 3780

aatagaactg gtccaagtct tccttttagat gtttttaatg ccacttatct taatctcact 3840

ggtgaaattg cagattttaga gcagcggtca gagtttctcc gtaatactac agaggatctc 3900

aaaagtctta tatataatat caacaacaca ctagttgacc ttgagtggct caaccgagtt 3960

gagacataca tcaagtggcc gtgggtgggtt tggttgatta ttttcattgt tctcatcttt 4020

gttgtgtcat tactagtgtt ctgctgcatt tccacgggtt gttgtggatg ctgcgctgc 4080

tgctgtgctt gtttctcagg ttgttgtagg ggtcttagac ttcaacctta cgaagttttt 4140

gaaaagggtcc acgtgcagtg a 4161

<210> 3

<211> 109

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> PEDV SPIKE

<400> 3

Gly Ala Glu Leu Val Lys Pro Gly Ala Ser Val Lys Phe Ser Cys Ser

1 5 10 15

Ala Ser Gly Cys Asn Ile Lys Asp Thr Tyr Met Tyr Leu Met Lys Gln
20 25 30

Arg Pro Glu Gln Gly Leu Glu Trp Ile Gly Arg Ile Asp Pro Ala Asn
35 40 45

Gly Asn Thr Lys Tyr Asp Pro Lys Phe Gln Gly Arg Ala Thr Met Thr
50 55 60

Ala Asp Thr Ser Ser Asn Thr Ala Tyr Leu Gln Leu Ser Ser Leu Thr
65 70 75 80

Ser Glu Asp Ala Ala Val Tyr Tyr Cys Val Arg Trp Ser Tyr Ser Phe
85 90 95

Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Thr Leu Thr Val Ser Ser
100 105

<210> 4

<211> 123

<

212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> PEDV SPIKE

<400> 4

Asp Ile Val Leu Thr Gln Ser Thr Leu Ser Leu Pro Val Ser Leu Gly
1 5 10 15

Asp Gln Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Gln Ser Ile Val His Ser
20 25 30

Asn Gly Asn Thr Tyr Leu Glu Trp Tyr Leu Gln Lys Pro Gly Gln Ser
35 40 45

Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Lys Val Ser Asn Arg Phe Ser Gly Val Pro
50 55 60

Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Lys Ile
65 70 75 80

Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Leu Gly Val Tyr Tyr Cys Phe Gln Gly
85 90 95

Ser His Val Pro Leu Thr Phe Gly Ala Gly Thr Lys Leu Glu Leu Lys
100 105 110

Arg Ala Asp Ala Ala Pro Thr Val Ser Lys Gly

115

120

<210> 5

<211> 327

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> PEDV SPIKE

<400> 5

ggggcagagc ttgtgaagcc aggggcctca gtcaagttct cctgctcagc ttctggctgc	60
aacattaaag acacctatat gtacttgatg aagcagaggc ctgaacaggg cctggagtgg	120
attggaagga ttgatcctgc gaatggtaat actaaatatg acccgaagtt ccagggcagg	180
gccactatga cagcggacac atcctccaac acagcctacc tgcagctcag cagcctgaca	240
tctgaggacg ctgccgtcta ttactgtgtt agatggagtt attcatttga ctactggggc	300
caaggcacca ctctcacagt ctectca	327

<210> 6

<211> 123

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> PEDV SPIKE

<400> 6

DIVLTQSTLS LPVSLGDQAS ISCRSSQSIV HSNGNTYLEW YLQKPGQSPK LLIYKVSNRF	60
SGVPDRFSGS GSGTDFTLKI SRVEAEDLGV YYCFQGSHVP LTFGAGTKLE LKRADAAPT	120
SKG	123